

JÚLIA AIKAWA

**ESTUDO DO METABOLISMO DA GLICOSE EM LINFÓCITOS OBTIDOS
DO BAÇO E LINFONODO MESENTÉRICO DE RATOS PORTADORES DO
TUMOR DE WALKER 256, SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS
POLIINSATURADOS ω -3 (PUFA n-3). PAPEL DOS PUFA n-3 NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL E CAQUEXIA.**

Monografia apresentada para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes.

CURITIBA

2001

Aos meus pais e ao meu irmão pela motivação constante e carinho infinito. Sem eles, eu não seria ninguém.

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pelo apoio, incentivo e muita paciência, que possibilitaram o desenvolvimento desta monografia.

À prof^a. MS. Alessandra Folador, pela amizade, ajuda, ensinamentos e conselhos proporcionados no cotidiano do laboratório.

Ao Marquinhos, uma pessoa muito especial, pela ajuda e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos Claudia, Miriam, Bandeira, Horst, Carlinhos, Negão, Korte, Cristiano, Parda pelo incentivo e descontraídas conversas.

Aos colegas de laboratório Ricardo, Osvaldo, Sandro, Fábio, Mariana, Claudinha, Karla, Valéria, Rita e Irlena, que proporcionaram um excelente ambiente de trabalho e entusiasmos diários.

A todos os meus colegas de faculdade, que tiveram ao meu lado nessa longa caminhada, pela amizade e dedicação.

E o departamento de Fisiologia, pelo espaço cedido ao meu trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
SISTEMA IMUNE.....	1
METABOLISMO DO LINFÓCITO.....	3
ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E SISTEMA IMUNE.....	4
CÂNCER E CAQUEXIA.....	7
ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E CÂNCER.....	9
II. OBJETIVOS	11
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 PROCEDIMENTOS.....	12
3.1.1 Obtenção e Transplante das Células do Tumor de Walker 256.....	12
3.2 PARÂMETROS ANALISADOS.....	13
3.2.1 Determinação do Peso do Tumor e Corpóreo.....	13
3.2.2 Determinação da Longevidade.....	13
3.3 PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS.....	14
3.4 Obtenção dos Linfócitos.....	15
3.5 Contagem dos Linfócitos.....	15
3.6 Incubação das células Linfóides.....	16
3.7 SOLUÇÕES.....	16
3.7.1 Solução Hemolítica.....	16
3.7.2 Solução para a Incubação.....	17
3.7.3 Solução para Medir Lactato.....	17
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
IV. RESULTADOS.....	20
V. DISCUSSÃO.....	31
VI. CONCLUSÃO.....	34
VII. REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	ácido araquidônico
AC	-	adenil ciclase
AMPc	-	proteína-cinase dependente de PKAc
BSA	-	albumina sérica bovina
C	-	grupo controle
DHA	-	ácido docosahexaenóico
EDTA	-	etileno diaminotetracético
EPA	-	ácido eicosapentaenóico
FL	-	fosfolipase
GLA	-	ácido gama-linolênico
Igs	-	imunoglobulinas
IFN- γ	-	interferon- γ
IL	-	interleucina
KR	-	krebs-Ringer
LDH	-	dehidrogenase láctico
NAD ⁺	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NK	-	“natural killer”
PF	-	grupo suplementado com ácido graxo poliinsaturado ω -3
PKA	-	proteína quinase A
PKC	-	proteína quinase C
PUFAs	-	ácidos graxos poliinsaturados
RTC	-	grupo controle e portador de tumor
RTPF	-	grupo suplementado com ácido graxo poliinsaturado ω -3 e portador de tumor
RTST	-	grupo suplementado com ácido graxo saturado e portador de tumor
ST	-	grupo suplementado com ácido graxo saturado
Tc	-	células T citotóxicas
TCA	-	ácido tricloroacético
Th	-	células T “helper”
TNF	-	fator de necrose tumoral- α

RESUMO

A funcionalidade do sistema imunológico é influenciada pela ingestão de ácidos graxos da dieta alimentar. Os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (PUFA), essenciais ao organismo, são responsáveis pela formação dos eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos e, em especial, no desenvolvimento do câncer. A caquexia no câncer está presente em 70% dos indivíduos que apresentam doença. O tumor de Walker 256 tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da caquexia no câncer induzida em ratos. O presente trabalho investigou se ratos suplementados com PUFA a partir do desmame e portadores do Tumor de Walker na fase adulta, têm a caquexia e velocidade de crescimento tumoral alteradas. Investigou-se também, o metabolismo de glicose dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico e baço. Para isso, determinou-se alguns parâmetros bioquímicos dos animais (glicemia e lactato sérico); a evolução da massa corpórea após inoculação do tumor; curva de sobrevivência e peso tumoral. A suplementação com PUFA reduziu significativamente o lactato sérico no grupo RTPF e o peso do tumor quando comparado ao RTC. A hipoglicemia encontrada nos animais com câncer não foi revertido pela suplementação. O tratamento com ácidos graxos poliinsaturados nos animais portadores de tumor, induziu a uma menor taxa de crescimento tumoral, proporcionou manutenção da massa corpórea e uma taxa de sobrevivência maior quando comparado aos demais animais não tratados. A implantação do tumor nos animais suplementados com PUFA promoveu uma baixa produção de lactato pelos linfócitos, tanto de linfonodo mesentérico, como baço. Os resultados sugerem que a suplementação com PUFA, por períodos crônicos, atua protegendo o organismo da ação do tumor e, o metabolismo da glicose, desempenha papel secundário neste processo.

I. INTRODUÇÃO

SISTEMA IMUNE

Os órgãos, células e moléculas responsáveis pela defesa do organismo às infecções constituem o sistema imunológico (SCROFERNEKER; POHLMANN, 1998). O sistema imune tem a responsabilidade de proteger o hospedeiro contra agentes infecciosos patogênicos (CALDER, 2001). As células e moléculas do sistema imune trabalham como um sistema de defesa integrado, objetivando eliminar o agente infeccioso e proporcionar imunidade protetora persistente (JANEWAY *et al.*, 2000). De modo geral, o sistema imune divide-se funcionalmente em duas categorias: sistema imune inato (ou natural) e sistema imune adaptativo, também denominado adquirido ou específico (CALDER, 2001). A interação entre essas duas categorias resulta no que chamamos de imunidade (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; BORGHANS; NOEST; BOER, 1999).

A resposta imunológica conta com a participação de vários tipos diferentes de células e de seus produtos, na ativação e modulação desta resposta. As principais células que compõem o sistema imunológico são os leucócitos, também chamados de células sanguíneas brancas. Pertencentes a este grupo de células estão incluídos os granulócitos e agranulócitos, classificados conforme a presença de grânulos citoplasmáticos e os polimorfonucleares e monomorfonucleares, classificados de acordo com a forma do núcleo. Os granulócitos polimorfonucleares, predominantemente responsáveis pela fagocitose, incluem os neutrófilos, eosinófilos e os basófilos, enquanto que os agranulócitos monomorfonucleares são representados pelos monócitos e linfócitos (SCROFERNEKER; POHLMANN, 1998).

Dentre os monomorfonucleares, embora com funções um pouco distintas, macrófagos e linfócitos são considerados as principais células de defesa do organismo. Enquanto que os macrófagos formam a primeira linha de defesa do sistema imunológico inato, os linfócitos fazem parte do sistema imunológico adaptativo. Contudo, como os macrófagos nem sempre conseguem eliminar e reconhecer os agentes invasores, os linfócitos proporcionam meios mais versáteis de defesa e maior

nível de proteção face a novas infecções pelos mesmos agentes (JANEWAY *et al.*, 2000).

Linfócitos são pequenas células redondas com núcleo grande característico e citoplasma em forma de rim. São encontrados no baço, medula óssea, linfonodos, timo e placa de Peyer (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985). Os linfócitos podem ser categorizados de acordo com seus marcadores de membrana, reações a estímulos, padrões de migração e vida média.

Os dois tipos principais de linfócitos são os linfócitos B, que participam da resposta humoral e os linfócitos T, responsáveis pela resposta imune celular (BERNE; LEVY, 2000). Na resposta humoral, os linfócitos B são ativados e diferenciam-se em plasmócitos, células produtoras de imunoglobulinas (Igs). Na resposta imune celular, linfócitos T são ativados e produzem citocinas que modulam, por exemplo, a ativação dos macrófagos (UNANUE; BENACERRAF, 1986).

Também fazendo parte da classe de linfócitos estão as células natural killer (NK), as quais não expressam marcadores de superfície. Estas células são funcionalmente distintas das células T e B (ou linfócitos T e B) pois são capazes de lisar células tumorais ou infectadas por vírus, e têm função importante na rejeição de transplantes. Células NK são ativadas por interleucina (IL)-2, IL-12, interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF)- α (CALDER, 1998).

As células T estão divididas em duas classes bem distintas: células T “helper” (Th) e células T citotóxicas (Tc). Essas classes são definidas pela presença de proteínas na superfície celular. Enquanto que as células Th expressam uma proteína transmembrana denominada CD4, as células Tc expressam um marcador denominado CD8. Células T “helper” aumentam a resposta de outras células brancas do sangue e algumas dessas células T auxiliam as células B a produzirem anticorpo. Células T citotóxicas, ao contrário, matam células infectadas porque estão diretamente envolvidas na defesa contra infecções. Estas duas classes de células reconhecem o peptídeo antigênico através das células apresentadoras de antígeno (APC) (ALBERTS *et al.*, 1997; ROITT; BROSTOFF; DAVID, 1998; CALDER, 2001). Além das funções descritas, os linfócitos Th e Tc também podem suprimir a resposta imunológica. Existe

outra classe de linfócitos, ainda não bem definida, com considerável controvérsia sobre sua natureza e fisiologia, conhecidas como células T supressoras. De fato, não é claro se a supressão da resposta imunológica é mediada por um tipo distinto de célula T ou por células que, dependendo da situação, podem agir como auxiliares ou citotóxicas (ABBAS, LICHTMAN; POBER, 1995).

As populações de linfócitos T helper são subdivididos funcionalmente de acordo com o padrão de citocinas que eles produzem. Linfócitos T helper tipo 1 (células Th1) produzem IL-2 e IFN- γ que ativam macrófagos, células natural killer e linfócitos T citotóxicos. A atividade das células Th1 podem ser induzidas por interações com agentes patogênicos como bactérias, vírus e fungos. Linfócitos T helper tipo 2 (células Th2) produzem IL-4, que estimula a produção de IgE pelos linfócitos, IL-5, um fator de ativação de eosinófilo, e IL-10, que juntamente com IL-4 suprime a imunidade mediada por célula. Células Th2 são responsáveis pela defesa contra helmintos, a qual é decorrente de mastócitos e basófilos ativados por IgE. Um desequilíbrio ou desregulação entre as respostas de Th1 e Th2 é uma característica de muitas doenças humanas, como reações alérgicas e doenças inflamatórias (MOSSMANN; SAD, 1996).

METABOLISMO DO LINFÓCITO

Os linfócitos normalmente presentes na circulação e nos tecidos linfóides encontram-se em estado quiescente, situação na qual apresentam-se metabolicamente pouco ativos. Um estímulo do tipo invasivo ou neoplásico é capaz de promover a ativação dessas células, levando-as a se proliferar, sintetizar e secretar substâncias (citocinas) envolvidas na resposta imune. A mudança para o estado ativado é também acompanhada de alterações metabólicas nessas células, onde as vias biossintéticas e energéticas são estimuladas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995). A ativação dos linfócitos B é caracterizada pela produção e secreção de várias substâncias mediadoras da resposta imunológica, os anticorpos. Já nos linfócitos T, é pela síntese dos mediadores da imunidade celular, linfocinas, fatores quimiotáticos e mitogênicos.

Para garantir todos esses processos, torna-se necessário o aumento da taxa metabólica desses linfócitos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995). Uma vez aumentada a taxa metabólica os linfócitos são, deste modo, capazes de garantir a síntese de macromoléculas e organelas para o processo de divisão celular. Para isso, as vias metabólicas responsáveis pela síntese de DNA, RNA e lipídios estruturais, como fosfolipídios e colesterol, devem apresentar atividade elevada bem como o suprimento adequado de energia na forma de ATP (CURI, 1993).

Células que possuem alta taxa de proliferação celular como linfócitos, células tumorais e células epiteliais intestinais utilizam glicose e glutamina em altas taxas. Contudo, a oxidação desses metabólitos é baixa. A glicose é convertida principalmente em lactato e a glutamina em glutamato, aspartato e lactato (ARDAWI; NEWSHOLME, 1983, 1985).

Glicose, para ser oxidada, deve ser convertida inicialmente a piruvato, que é descarboxilado no ciclo do ácido tricarboxílico. Na via glicolítica, a glicose é convertida em piruvato e lactato (duas moléculas de 3 átomos de carbono) e para cada mol de glicose consumida, 2 mols de ATP são gerados (CURI; NEWSHOLME; NEWSHOLME, 1988).

ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E SISTEMA IMUNE

Vários trabalhos tem demonstrado que um grande número de fatores nutricionais modulam as funções imunológicas (CALDER, 1998). Interesse a este respeito iniciou-se pela observação de imunodeficiência em crianças mal-nutridas. Assim, atenção especial tem sido direcionada ao papel de nutrientes específicos na responsividade imunológica como, por exemplo, a deficiência de zinco em animais adultos (FERNANDES *et al.*, 1979). Associada a esta condição, observa-se resposta imunológica diminuída, particularmente aquelas mediadas por linfócitos T (IWATA *et al.*, 1979). Tem sido também mostrado que a deficiência de zinco influencia no curso de infecções e neoplasias (BEACH; GERSCHWIN; HURLEY, 1981). Observações

similares têm sido demonstradas em humanos (GOLDEN *et al.*, 1978; PEKAREK *et al.*, 1979).

Outros estudos também mostram que a funcionalidade do sistema imunológico é influenciada pela ingestão de ácidos graxos na dieta alimentar. As observações de que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 diminuem a severidade de doenças autoimunes (CLAUSEN; MOLLER, 1969; MEADE; MERTIN, 1978; MERTIN; HUGHES, 1975), aumentam a incidência de certos tipos de câncer e facilitam o crescimento tumoral (CARROLL; KHOR, 1975) encorajaram outros investigadores a estudar a resposta imunológica em animais alimentados com dietas ricas em ácidos graxos ω -6.

Há duas principais famílias de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). A n-3 (ômega-3 ou ω -3) e n-6 (ômega-6 ou ω -6), as quais não são interconversíveis. A família ω -6 é derivada do ácido graxo essencial linoleico; a família ω -3 é derivada do ácido graxo α -linolênico. Esses dois ácidos são “essenciais” porque não podem ser sintetizados no organismo, dessa forma devem ser providos pela dieta.

O ácido linoleico foi o primeiro ácido graxo a ser identificado como essencial e nos últimos 20-30 anos seu consumo tem sido encorajado pelos médicos devido a sua habilidade em diminuir a concentração plasmática de colesterol.

Os derivados do α -linolênico, em particular, o ácido docosahexaenóico (DHA) tem se mostrado como principal constituinte dos fosfolípidos de membrana do cérebro humano e retina (ANDERSON, 1970).

O ácido araquidônico (AA) derivado dos ácidos graxos essenciais (ω -6 e ω -3) é o principal responsável pela formação dos eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas), os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como a resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e a formação de interleucinas. Ainda, os eicosanóides derivados do AA da família ω -3, tendem a produzir respostas imunológicas mais amenas (POMPÉIA; PROCÓPIO; CURI, 1999). Isto tem levado ao interesse em investigar se há um papel para alimentos ricos em ácidos graxos de cadeia longa (mais de 18 átomos de carbono) no tratamento de condições inflamatórias como artrite reumatóide (ROUBENOFF *et*

al., 1992) e nos efeitos catabólicos das citocinas em vários tipos de câncer (TISDALE, 1996).

O ácido eicosapentaenóico (EPA) é o principal ácido graxo n-3 metabolicamente ativo. Ele é sintetizado pelas algas marinhas e é encontrado na dieta como um componente do óleo de peixe. Tem sido demonstrado que a suplementação com óleo de peixe rico em ácidos graxos n-3 reduz a produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF pelas células mononucleares em voluntários normais, sendo este efeito mantido por várias semanas após a interrupção da suplementação (ENDRES *et al.*, 1989; COOPER *et al.*, 1993; MEYDANI *et al.*, 1993; AL; VAN HOUWELINGER; HORNSTRA, 1993). Óleo de peixe é capaz de aumentar os efeitos T-supressores, por diminuir o linfócito T citotóxico, células NK ("Natural Killer") e linfócito T "helper". Diminui também a resposta proliferativa das células T a mitógenos, diminui a resposta da pele à hipersensibilidade-tardia e reduz a quimiotaxia dos neutrófilos (LEE *et al.*, 1985; ENDRES *et al.*, 1989; MEYDANI *et al.*, 1993; CALDER, 1996). Dietas enriquecidas com PUFA's diminuem a produção de IL-2 pelos linfócitos de murinos e humanos (CALDER, 1996, 1998). A IL-2 e IFN- γ estão envolvidos na imunidade célula-mediada, na ativação de macrófagos e células NK; portanto, atuam na rejeição de transplantes e reações inflamatórias. Há pouca informação sobre os efeitos da dieta de ácidos graxos sobre a produção de citocinas tais como IL-4, que é produzida pelos linfócitos da classe Th2, envolvidos nas reações alérgicas e respostas anticorpo-dependente. WALLACE *et al.* (1999) relataram que camundongos submetidos a dieta de ácido graxo saturado apresentavam redução na produção de citocinas derivadas de seus Th1, mas não apresentavam alteração em suas citocinas derivadas de Th2.

O EPA também inibe a proteólise em modelos de animais com caquexia no câncer (TISDALE, 1996) e tem sido sugerido que isto é devido a inibição dos efeitos dos fatores lipolíticos e proteolíticos derivados do tumor sobre os órgãos alvo. Além disso, este ácido graxo pode modificar a resposta dos hepatócitos às citocinas pró-inflamatórias em termos da produção das proteínas de fase aguda (WIGMORE; FEARON; ROSS, 1997). Assim, parece que os PUFA's n-3 podem afetar não apenas a produção de mediadores pró-inflamatórios, mas também seus efeitos nos órgãos alvo.

Há numerosos mecanismos pelos quais isto pode ocorrer. Ácidos graxos poliinsaturados também influenciam vários receptores e enzimas, os quais tem papel fundamental na sinalização celular. Quando agonistas estimulam receptores de membrana, eles ativam a adenil ciclase (AC) ou a fosfolipase (FL), os segundos mensageiros produzidos a partir destes (lípidos no caso da FL), influenciam as ações da proteína kinase dependente de AMPc (PKA) e da proteína kinase C (PKC), respectivamente. Os n-3 influenciam os efeitos da AC (ALAM; REN; ALAM, 1988; TISDALE, 1993), FLA2 (BALLOU; CHEUNG, 1985), PKA (SPEIZER et. al., 1991) e PKC (SPEIZER et. al., 1991; HOLIAN; NELSON, 1992). Ácido eicosapentaenóico também liga-se a canais de sódio voltagem-sensíveis de membrana e podem alterar a condutância destes canais (KANG; LEAF, 1996) e ácidos graxos n-3 podem ligar-se aos receptores de glicocorticóides, em local diferente daquele de ligação do hormônio, reduzindo grandemente sua afinidade pelo receptor (VALLETE *et al.*, 1991; SUMIDA; VALLETE; NUNEZ, 1993). Vários outros estudos também tem sido realizados mostrando como os ácido graxos n-3 podem modular a inflamação (DEVCHAND *et al.*, 1996; KELLER *et al.*, 1993; GIACOSA *et al.*, 1996).

CÂNCER E CAQUEXIA

O câncer é responsável pela morte de aproximadamente 4 milhões de pessoas por ano em todo mundo. Atualmente no Brasil, o câncer constitui a segunda causa mais comum de morte por doença, depois de doenças cardiovasculares (BRASIL. Ministério da Saúde, 1997).

O câncer é uma doença na qual células alteradas, denominadas neoplásicas, não respondem mais aos mecanismos de controle do crescimento celular e proliferam-se excessivamente, de maneira descontrolada, formando uma protuberância ou massa tecidual conhecida como neoplasia. A neoplasia significa literalmente “novo crescimento” (STEVENS; LOWE, 1998). Os termos neoplasia e tumor são usados

como sinônimos. O termo tumor, originário do latim, significa tumefação, foi aplicado originalmente ao inchaço causado pela inflamação.

Câncer é termo comum para todos os tumores malignos. Deriva do latim no qual significa carangueijo, talvez porque “adere-se a qualquer parte que acomete, de forma obstinada, tal como um carangueijo” (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994).

Tumores podem ser divididos em dois tipos: em benignos, quando o crescimento celular permanece contido numa massa única, ou em malignos, quando conseguem invadir e se desenvolver em outros tecidos, formando metástases, sendo assim definidos como cânceres. Tumores malignos podem ser, ainda, classificados de acordo com o tecido e tipo celular de origem; sarcomas originam-se de tecidos conjuntivos ou musculares, enquanto que carcinomas derivam de células epiteliais e leucemias de células hematopoiéticas (ALBERTS *et al.*, 1997).

O crescimento tumoral está associado a manifestações clínicas sistêmicas significantes, como anorexia, astenia, perda de peso, saciedade prematura e anemia. Todos estes sinais e sintomas caracterizam a síndrome da caquexia (THEOLOGIDES, 1979). A caquexia, palavra derivada do grego **Kakos**, que significa “mal, ruim” e **hexis** que significa “condição do corpo” está presente em 70% dos indivíduos que morrem com câncer (THEOLOGIDES, 1979; ARGILES, 1999). A caquexia não se manifesta somente no câncer, ela também é observada em uma variedade de condições inflamatórias tais como sepsis, na Síndrome da Imunidade Adquirida e na artrite reumatóide, entre outras (ROUBENOFF *et al.*, 1992; CANGIANO *et al.*, 1996).

Os mecanismos envolvidos na indução da caquexia no câncer não são totalmente conhecidos, mas a diminuição da ingestão protéico-calórica, impossibilitando a manutenção das reservas energéticas (anorexia), é um dos achados mais freqüentes nos portadores de câncer (GIACOSA, 1996). No entanto, o fracasso na resposta dos indivíduos caquéticos ao apoio nutricional demonstrou que o definimento do portador não deva estar relacionado apenas com seu comportamento alimentar deficiente, mas também, com mudanças no metabolismo intermediário ocasionadas pelo tumor (ARGILES *et al.*, 1997; SAKURAI, *et al.*, 1998).

ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E CÂNCER

Nas duas últimas décadas tem sido explorado extensivamente os efeitos dos diferentes tipos de ácidos graxos da dieta sobre o câncer. Em grande parte desse interesse, os ácidos graxos poliinsaturados são os mais estudados. Resultados experimentais tem estabelecido que certos PUFAs são seletivamente tóxicos para células tumorais, efeito que é particularmente devido a produção de superóxidos. Os PUFAs também exercem ação reguladora na motilidade de células tumorais, na invasão e no comportamento metastisante (JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998).

A relação entre o consumo de gorduras na dieta e o câncer tem sido talvez melhor demonstrada nas populações de esquimós, que consomem dietas ricas em PUFA n-3 e apresentam baixa incidência de câncer além de outras doenças, como as inflamatórias (KROMANN; GREEN, 1980). Similarmente, outras populações que também consomem uma elevada quantia de ácidos graxos poliinsaturados, como os japoneses, apresentam baixa incidência de câncer de mama nas mulheres.

Nos últimos anos, vários estudos clínicos tem relatado o uso de ácidos graxos no tratamento de pacientes com câncer (BARBER *et al.*, 1999; CAYGILL *et al.*, 1996; TISDALE, 1996). Alguns estudos têm mostrado que há evidências crescentes de que a dieta pode influenciar o risco de desenvolver melanoma. Acredita-se, atualmente, que o consumo alto de ácidos graxos n-6 estimulam o crescimento de melanoma, assim como, outros tipos de câncer, enquanto que ácidos graxos ômega-3 suprimem o crescimento de células com câncer (ALBINO *et al.*, 2000). Os autores deste trabalho mostram claramente que o ácido docosahexaenóico, principal componente de óleo de peixe, é altamente efetivo em inibir o crescimento de células de melanoma em humanos.

Em pacientes com câncer pancreático, tem sido demonstrado que a suplementação com óleo de peixe tem o potencial de ser um meio seguro e efetivo em prevenir a perda de peso (BARBER *et al.*, 1999), até mesmo nos pacientes que já apresentam caquexia, problema comum neste tipo de câncer (WIGMORE *et al.*, 1996). Segundo estes autores, o quadro caquético pode ser interrompido por essa

suplementação. Outro estudo clínico também tem relatado que pacientes com câncer pancreático têm melhora na perda de peso e na caquexia, sugerindo o efeito anti-caquético ao EPA, pois este pode regular as proteínas de fase aguda e citocinas inflamatórias tais como IL-6 e TNF (WIGMORE *et al.*, 1996).

A suplementação com GLA (ácido gama-linolênico), EPA e DHA em pacientes com câncer colorretal tem modificado o perfil das citocinas incluindo redução de IL-1, IL-6 e TNF (PURASIRI *et al.*, 1994).

O câncer de mama, neste aspecto, tem sido de grande interesse e ao mesmo tempo foco de discussão. A dieta contendo PUFA's tem sido relatada exercer diversos efeitos sobre células com este tipo de câncer em animais e humanos portadores dessa doença. *In vitro*, o ácido linoléico estimula o crescimento e invasão de células com câncer de mama enquanto que, GLA e EPA inibem estes parâmetros. Contudo, quando estudos com animais foram realizados, os efeitos foram diversos com alguns estimulando e outros inibindo crescimento tumoral e metástase (JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998). Em relação aos estudos epidemiológicos, tem sido relatado controvérsias significantes, na qual alguns sugerem a positiva correlação entre o consumo de ácidos graxos n-6 e o câncer de mama (PRENTICE; SHEPPARD, 1990 e SASAKI; HORACSEK; KESTELOOT, 1993) enquanto que outros negam tal relação (BAKKER; VAN'T VEER; ZOCK. *et al.*, 1997 e PETREK; HUDGINS; LEVINE, 1994).

De um modo geral, os dados mencionados acima têm apresentado grande variabilidade nos resultados no que diz respeito a relação entre dieta de PUFA's e seus efeitos sobre o câncer. Um dos fatores que poderia gerar tais controvérsias seria a diferença na composição dos ácidos graxos na dieta. Então, as condições estabelecidas são importantes para explicar as diferenças nos resultados obtidos.

II. OBJETIVOS

Tem sido sugerido que os PUFA's exercem efeitos quimioprotetores e podem minimizar os efeitos do câncer. O mecanismo pelo qual eles o fariam é matéria de debate. Alguns pesquisadores defendem ação direta sobre a célula tumoral, outros sobre o sistema imunológico. Sob a luz do exposto, este trabalho objetivou investigar se ratos suplementados com PUFA n-3 a partir do desmame e portadores de tumor na fase adulta, tem a caquexia e velocidade de crescimento tumoral alteradas. E também investigou, o metabolismo de glicose dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico e baço. Para alcançar estes objetivos fez-se as seguintes abordagens:

- Acompanhamento da evolução da massa corpórea após inoculação do tumor;
- Mensuração de alguns parâmetros bioquímicos sanguíneos (lactato e glicemia);
- Curva de sobrevivência;
- Peso do tumor;
- Produção de lactato a partir de glicose pelos linfócitos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, adquiridos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todos os animais receberam água e ração à vontade, submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas) e mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

As ratas foram divididas em 3 grupos distintos, sendo dois grupos suplementados com ácido graxo, diariamente, desde o desmame até atingirem a maturidade sexual (90 dias): 1) Um grupo que recebeu dieta suplementada com 1g/kg p.c. de óleo de peixe (ácido graxo poliinsaturado n-3). O óleo de peixe foi obtido de uma preparação de lípides marinhos (cápsula de 1g de MaxEPA com 180 mg de EPA e 120mg de DHA); 2) outro que recebeu suplementação alimentar com óleo de côco, um ácido graxo saturado (Gordura de côco, Brasil: Refino de óleos LTDA.), na dose de 1g/kg p.c. e 3) O grupo controle, que não recebeu suplementação.

As fêmeas então foram colocadas para reprodução com machos, não submetidos a esta suplementação. A prole de machos F1 resultante foi submetida ao mesmo tratamento da mãe logo após o desmame (21 dias) e, ao atingirem a maturidade sexual foram divididos em dois subgrupos, sendo a metade inoculada com tumor de Walker 256 (W256), segundo Fernandes *et al.*, 1991 e a outra metade, o controle. As mães foram colocadas novamente para a cópula para gerar novo grupo de estudo.

3.1 PROCEDIMENTOS

3.1.1 Obtenção e Transplante das Células do Tumor de Walker 256

O tumor de Walker 256 foi descoberto por George Walker em 1928 no John's Hopkins University School of Medicine, o qual desenvolveu-se espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida e foi caracterizado como adenoma. A massa tumoral foi descrita como sendo uma massa firme, lobulada e encapsulada,

produtora de metástases em linfócitos regionais, pulmonares e retroperitoneais (McCOY; NEUMAN, 1956; MIDER *et al.*, 1948). O tumor de Walker é um modelo importante para estudos da caquexia induzida pelo câncer, levando a morte do animal em 15 dias (GUAITANI *et al.*, 1983).

A partir do sacrifício de um animal portador do tumor ascítico de Walker 256, injetou-se 10 ml de solução salina 0,9% na cavidade abdominal tomando-se cuidado para não perfurar o intestino. Após massagear a região, abriu-se o abdômen (pequeno corte) e retirou-se o líquido com o auxílio de pipeta Pasteur. A seguir, procedeu-se a contagem das células em câmara de Neubauer usando azul de Tripán. Após a contagem, 1 ml dessa suspensão, contendo 2×10^7 células, foi injetada subcutaneamente no flanco direito dos animais dos grupos experimentais (FERNANDES *et al.*, 1991). Os ratos controle receberam 1ml de salina 0,9%. A quantidade inoculada assegurou que a massa tumoral representasse pelo menos 7 a 10% do peso da carcaça do animal quando da finalização do período experimental. Após 14 dias, todos os animais foram sacrificados e vários parâmetros mensurados.

3.2 PARÂMETROS ANALISADOS

3.2.1 Determinação do Peso do Tumor e Corpóreo

Após a extirpação do tumor dos animais, foi aferido em balança digital Denver Instrument XL-410. Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias, sempre no período da tarde.

3.2.2 Determinação da Longevidade

Um lote de ratos machos, dos respectivos grupos, foi inoculado com tumor W256 e acompanhado por 25 dias, neste período foi observado o número de animais

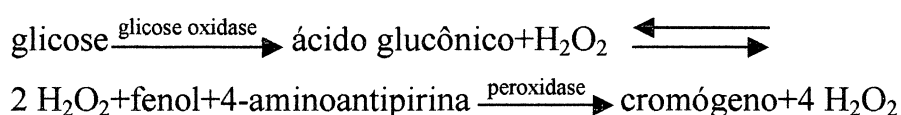
que sobreviveram. A cada 5 dias, estes eram contados para a determinação da porcentagem de sobrevivência, através do número de animais que permaneciam vivos nos respectivos grupos.

3.3 PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

Os ratos foram sacrificados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina e o sangue, tumor e tecidos linfóides coletados.

Do sangue coletado foi determinado as concentrações plasmáticas de:

a) Glicose: pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se Kit Glicose E enzimática da Labtest, segundo TRINDER (1969). As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante do Kit. A glicose presente na amostra foi determinada segundo a reação:



A intensidade da cor formada foi diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra de soro. A leitura de absorbância foi feita no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) a 505nm, e após a medida da absorbância para a glicose, foi calculada a concentração desta em mg/dL segundo a fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \frac{\text{D.O. amostra} \times n}{\text{D.O. padrão}}$$

onde:

[Glicose] = Concentração de glicose na amostra

D.O. = Densidade óptica da amostra

n = Fator de cálculo

b) Lactato: determinado por método enzimático, segundo a metodologia de ENGEL e JONES (1978). Inicialmente, foi feita a desproteinização do soro, adicionando 50 µl de ácido tricloroacético (TCA 25%) em 500 µl de soro e a mistura foi agitada em

vórtex e centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm. Em seguida, coletou-se 200 µl do sobrenadante e adicionou-se 2 µl de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro por adição de KOH/TRIS (0,5M/2M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7.0. Em seguida, 100 µl do soro neutralizado foi pipetado em tubos de ensaio contendo 1ml do tampão de ensaio, e após 45 minutos efetuou-se a leitura de absorbância a 340 nm por espectrofotometria.

3.4 Obtenção dos Linfócitos

Dos animais sacrificados, os linfonodos mesentéricos e baços foram retirados e dissecados. Os linfócitos do linfonodo mesentérico foram obtidos por compressão no cilindro de malha (dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros que podem ser acoplados, cujas extremidades de cada um contêm um sistema de malha). Deste sistema obteve-se linfócitos íntegros e isolados de gordura (VIEIRA et al, 1990). Os linfócitos foram mergulhados em solução salina 0,9% para filtragem em papel filtro especial, Whatman nº 105 e centrifugadas a 1200-1400 rpm, 4° C, 3 vezes durante seis minutos. Os linfócitos do baço foram igualmente obtidos após retirada do órgão e, após a filtragem, os mesmos foram mergulhados em solução hemolítica por 15 minutos, em banho Maria a 37°C, para remoção das hemácias. Em seguida centrifugou-se a amostra e a mesma foi lavada em salina 0,9% e centrifugada mais 2 vezes. Ao final, fez-se a incubação dessas células.

3.5 Contagem dos Linfócitos

Obtidas as células linfóides, fez-se a contagem na câmara de Neubauer. Para isto, as células foram diluídas numa proporção de 1:100 em salina a 0,9 %, seguida de uma diluição 1:2, ou seja, 100 µl da amostra para 100 µl do corante azul de Tripan.

Coletou-se uma alíquota para a contagem. Observaram-se apenas as células brilhantes e refringentes a luz, as demais coradas em azul foram consideradas inviáveis.

3.6 Incubação das células Linfóides

As células foram incubadas em tampão Krebs-Ringer, pH 7,3, na presença de albumina sérica bovina (BSA) livre de gordura, a 1% e utilizando-se como substrato glicose 5,6 mM, por 60 minutos a 37° C em banho Maria sob agitação. Ao término da incubação, foi adicionado 0,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 25% para interromper a reação. O material foi centrifugado a 14.100 rpm por 30 segundos e 0,5 ml do sobrenadante foi neutralizado com solução KOH 40% e TRIS / KOH (0,5M/2M) para a determinação do lactato, como descrito acima.

3.7 SOLUÇÕES

3.7.1 Solução Hemolítica

A solução hemolítica é formada por dois compostos:

- 1) 830 mg de Cloreto de amônio em 100 ml de água, pH 5,6
- 2) 206 mg de Tris (base) em 100 ml de água, pH 7,65

Para o preparo dessa solução, utiliza-se 9 partes de Cloreto de amônio para 1 parte de Tris (base), acertando o pH para 7,2. Lembrando-se que a mistura dos dois compostos deve ser feito no dia do experimento.

3.7.2 Solução para a Incubação

A solução usada para a incubação é formada pelo Tampão KR + BSA 1% + Glicose 5,6 mM. Para 20 ml de KR, pesa-se 0,2 g de BSA 1% e 0,020 g de glicose. O Tampão Krebs-Ringer é descrito a seguir:

Tampão de Krebs-Ringer (KR)

NaCl 0,9% + Hepes 10 mM		100 ml
CaCl ₂	0,11 M	1,5 ml
KH ₂ PO ₄	2,11 %	1 ml
Mg SO ₄	3,82 %	1 ml
KCl	1,15 %	4 ml
Na HCO ₃	1,3 %	21 ml

Preparo:

- Após a mistura dos compostos, gaseificar com O₂ 95% por 15 minutos (cobrir com um plástico para não perder muito gás);
- Acertar o pH com HCl / NaOH para 7,4;
- Adicionar a albumina sérica bovina (BSA) 1% do volume total e esperar que ela dissolva no meio a 37°C;
- Adicionar a glicose na concentração de 5,6 mM do volume total.

OBS: Preparar o tampão Krebs-Ringer somente no dia que será usado (as soluções separadas podem ser preparadas antecipadamente e armazenadas a 4°C; adicionar a glicose e o BSA apenas na hora do uso).

3.7.3 Solução para Medir Lactato

Para 100 ml de tampão, prepara-se:

Glycina 2,8%

EDTA (etileno diaminotetracético) 0,28%

Água 100 ml

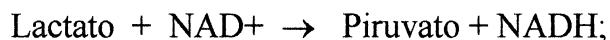
Hidrato de Hidrazina 1,5 ml

LDh (dehidrogenase láctico) 0,4 ml

NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) 0,060 %

Preparo:

- Pesar o EDTA, colocar em um balão volumétrico e completar até o volume desejado com água, agitar por alguns segundos;
- Esperar decantar, caso não ocorra, centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos;
- Pesar a glicina, acrescentá-la e agitar;
- Colocar o hidrato de hidrazina (bloqueia o retorno do piruvato a lactato), agitar e acertar o pH para 8,85;
- Colocar o NAD⁺ e por último o LDh, agitar;
- Depois de pronto o tampão, coloca-se 200 µl do meio (amostra neutralizada) mais 1 ml do tampão em tubos de ensaio pequenos;
- Para o tubo branco, coloca-se 200 µl de água mais 1 ml do tampão;
- Agita-se os tubos em vórtex e deixa-se agir por 45 minutos a temperatura ambiente:



- Faz-se a leitura no espectrofotômetro na absorbância de 340 nm, contra referência do branco;
- Determina-se o lactato produzido:

$$[\text{Lactato}] \mu\text{M/h}/10^7 \text{células} = \frac{\text{D.O.}}{6,22} \times \frac{\text{A}}{\text{B}} \times \frac{\text{C}}{\text{D}} \times \frac{\text{E}}{\text{F}} \times \frac{1}{\text{G}}$$

sendo:

D.O. = Densidade óptica da amostra

6,22 = constante

A = volume do tampão de lactato + volume da amostra

B = volume da amostra

C = volume de incubação + TCA 25%

D = volume de incubação

E = volume do centrifugado coletado + I.U + neutralizantes

F = volume do centrifugado

G = nº de células

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média dos grupos experimentais e foram submetidos à análise por ANOVA seguido de pós-teste de TUKEY, com nível de significância para $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Na figura 1 está representado a curva de variação de peso corpóreo (%) dos grupos estudados, ao longo de 14 dias. Nos animais controle (C), houve 17% de ganho de peso ao final de 12 dias. Nos grupos suplementados com ácido graxo saturado (ST) e PUFA n-3 (PF), o ganho foi de 12% e 6%, respectivamente, sendo apenas o grupo PF estatisticamente diferente quando comparado ao C ($p<0,05$). No animal com tumor (RTC), ao final de 12 dias, houve perda de 15% da massa corpórea sendo estatisticamente diferente quando comparado ao C, ST e PF. No grupo ST com tumor a massa corpórea não se alterou, ficando a mesma do dia zero e foi significativamente diferente ($p<0,05$) quando comparado ao C. No RTPF houve ganho de 1% da massa corpórea, a qual foi significativamente diferente ($p<0,05$) da do animal controle e não significativa ao comparar-se aos demais grupos.

Na figura 2 está representado a curva de sobrevivência (%) dos animais portadores de tumor suplementados com ácido graxo e não suplementados, onde o número de animais inoculados com tumor (dia zero) foi considerado 100%. Ao final de 5 dias, no grupo RTC e RTST houve 10% de mortalidade e no RTPF não foi encontrado nenhuma morte. No 10º dia, no RTPF não foi observada nenhuma mortalidade. Entretanto, nos RTC e RTST houve 20% de animais mortos. No 15º dia, 60% dos animais do grupo RTC e RTST morreram e no RTPF apenas 18%. No 20º dia, o RTPF manteve esta porcentagem, entretanto no RTC e RTST apenas 30% estavam vivos. No 25º dia, no RTC e RTST, apenas 25% e 10% estavam vivos, respectivamente e, no RTPF foi observado 50% de animais vivos.

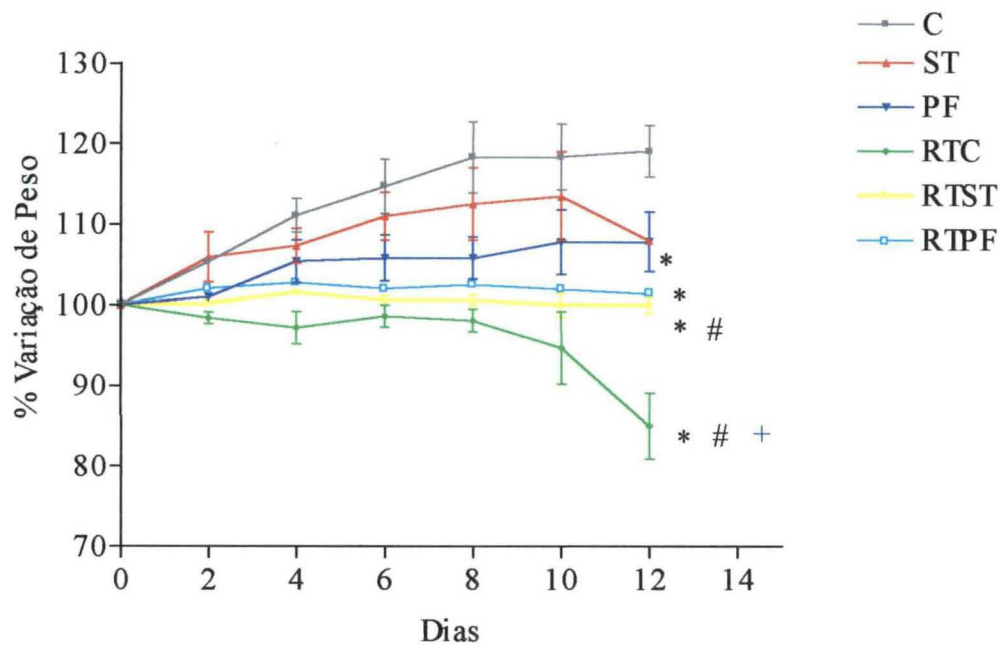


Figura 1: Curva de variação de peso corpóreo (%) nos grupos C, RTC, ST, RTST, PF e RTPF no período de 14 dias (após inoculação do tumor de Walker 256). Os dados representam a média \pm EPM.

* Diferença significativa da curva de variação de peso quando comparado ao grupo C.

Diferença significativa da curva de variação de peso quando comparado ao grupo ST.

+ Diferença significativa da curva de variação de peso quando comparado ao grupo PF.

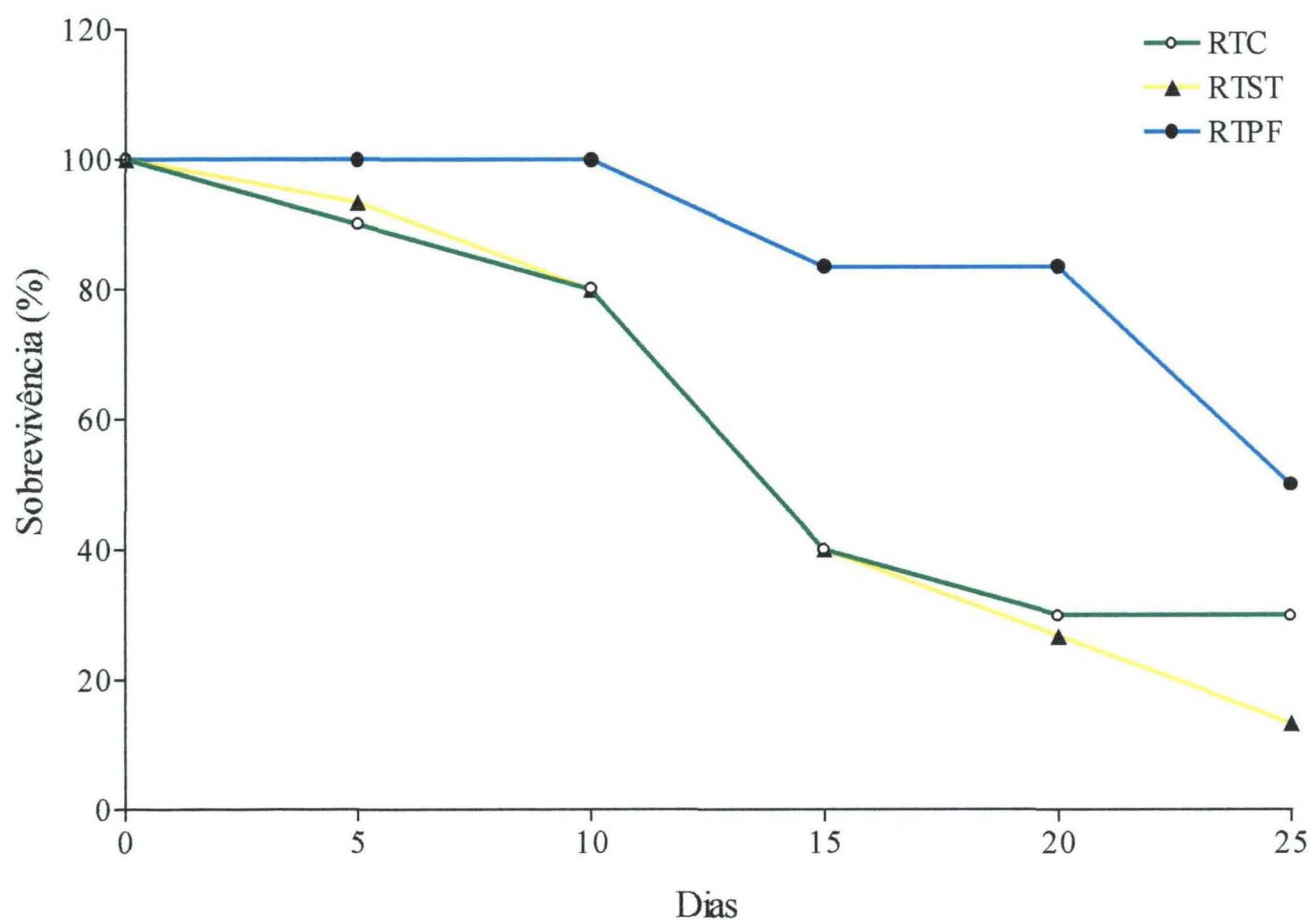
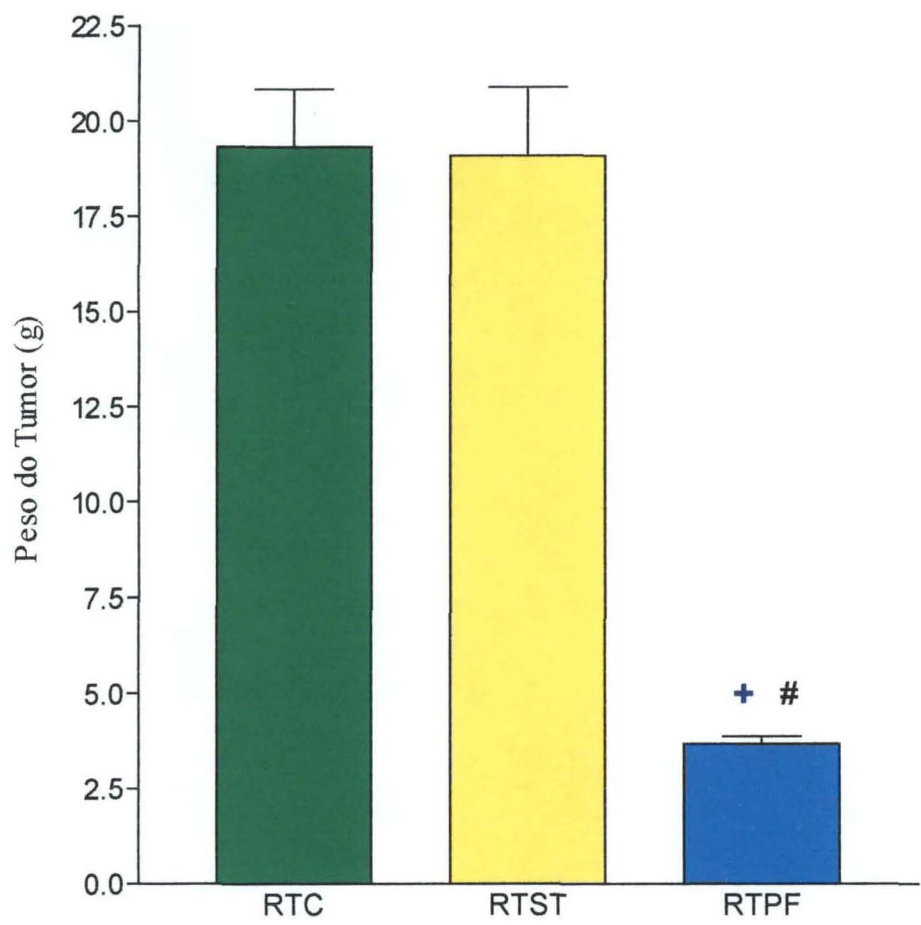


Figura 2: Curva de sobrevivência (%) de ratos portadores do tumor de Walker 256 dos grupos RTC, RTST e RTPF. Os dados representam o número inicial de 10 ratos no grupo RTC, 15 no RTST e 12 no RTPF.

Na figura 3 estão representados os dados do peso do tumor (g) dos animais portadores de tumor de Walker 256. Após 14 dias, no grupo portador de tumor tratado com PUFA, o peso do tumor foi aproximadamente 7 vezes menor quando comparado ao grupo RTC e RTST ($p < 0,05$). O tratamento com ácido graxo saturado não modificou o peso do tumor ficando este igual ao grupo portador de tumor sem suplementação.



GRUPOS	MÉDIA	EPM
RTC	19.329	1.52
RTST	19.09	1.8
RTPF	3.69	0.2

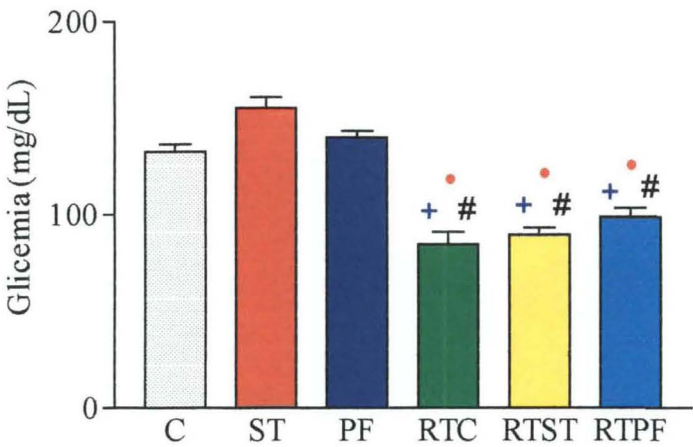
Figura 3: Peso de tumor (g) dos grupos RTC, RTST e RTPF. Os dados representam a média ± EPM.

+ Diferença significativa quando comparado ao grupo RTC.

Diferença significativa quando comparado ao grupo RTST.

Na figura 4 está representada a glicemia (mg/dL) dos animais normais, suplementados e portadores de tumor de Walker 256. O tratamento com os diferentes ácidos graxos não promoveu alteração da glicemia quando comparado ao grupo controle. A presença de tumor após 14 dias induziu a hipoglicemia no grupo RTC, a qual foi significativa quando comparado aos grupos C, ST e PF. No grupo RT suplementado com ácido graxo saturado este parâmetro foi igual ao grupo RTC. O tratamento com PUFA promoveu recuperação parcial da glicemia quando comparado aos grupos RTC e RTST ($p < 0,05$). Entretanto, esta ainda foi significativamente menor quando comparada aos grupos sem tumor.

Na figura 5 estão representados os dados da laticidemia sérica ($\mu\text{mol/ml}$) dos grupos estudados. O tratamento com os dois tipos de ácidos graxos não promoveu alteração significativa da laticidemia quando comparado ao controle. No grupo RTC, após 14 dias, o lactato sérico elevou-se significativamente quando comparado ao C, ST e PF. No grupo com tumor e suplementado com ST, esta continuou elevada sendo estatisticamente diferente quando comparada os grupos C, ST e PF, porém igual ao RTC. O tratamento com PUFA n-3 no grupo com tumor reduziu a laticidemia de maneira significativa quando comparado aos grupos RTC e RTST, entretanto não atingiu os valores controle, sendo ainda significativamente maior quando comparado aos grupos C, ST e PF.



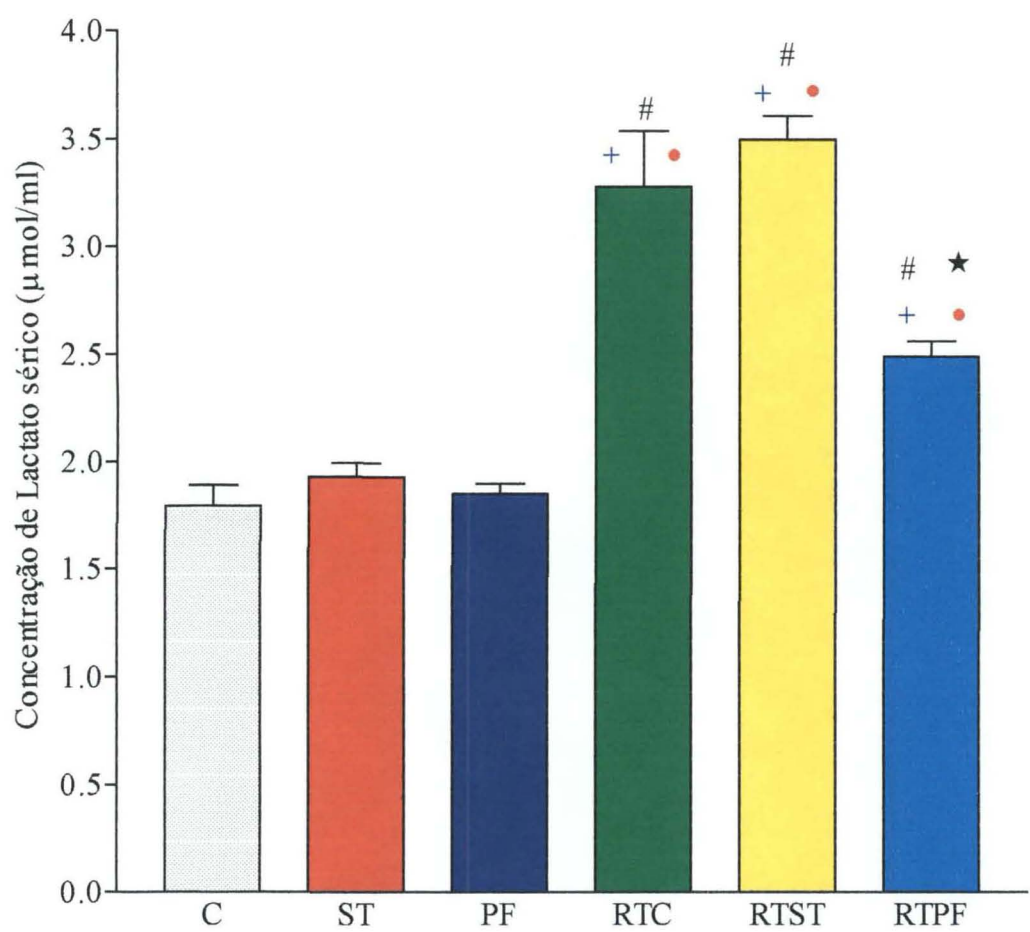
GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	132.70	3.92
ST	155.54	5.66
PF	140.37	3.15
RTC	84.79	6.22
RTST	89.56	3.84
RTPF	98.89	4.73

Figura 4: Glicemia (mg/dL) dos animais dos grupos C, ST, PF e dos grupos portadores de tumor RTC, RTST, RTPF. Os dados representam a média ± EPM.

+ Diferença significativa quando comparado ao C.

Diferença significativa quando comparado ao ST.

• Diferença significativa quando comparado ao PF.



GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	1.793	0.097
ST	1.927	0.066
PF	1.851	0.047
RTC	3.28	0.26
RTST	3.50	0.11
RTPF	2.49	0.07

Figura 5: Produção de lactato sérico dos grupos C, ST, PF e dos grupos portadores de tumor RTC, RTST, RTPF. Os dados representam a média ± EPM.

+ Diferença significativa quando comparado ao C.

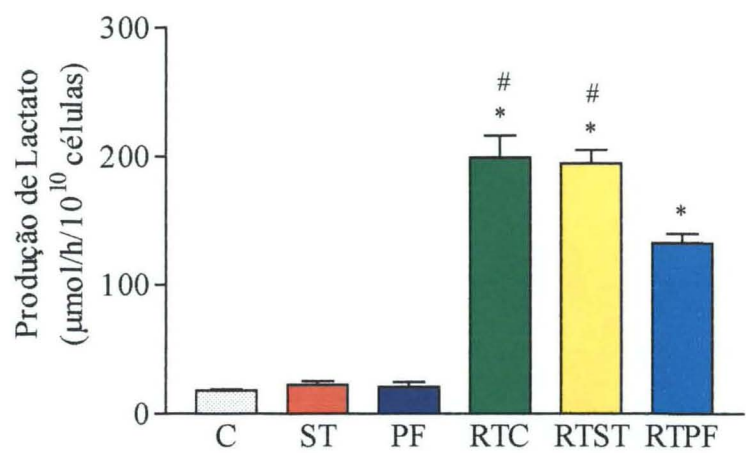
Diferença significativa quando comparado ao ST.

• Diferença significativa quando comparado ao PF.

φ Diferença significativa quando comparado aos grupos RTC e RTST.

Na figura 6 estão representados os dados sobre a produção de lactato, a partir de glicose, pelos linfócitos obtidos do baço dos animais dos grupos estudados. A suplementação com os ácidos graxos ST e PUFA não promoveu mudança significativa na produção de lactato quando comparado ao grupo controle. Nos RTC e RTST esta produção foi elevada em aproximadamente 6 vezes ($p<0,05$) quando comparado aos grupos C, ST e PF e, no grupo RTPF a produção de lactato foi significativamente menor quando comparado ao RTC e RTST ($p<0,05$).

Na figura 7 estão representados os dados da produção de lactato, a partir de glicose, pelos linfócitos dos linfonodos mesentéricos dos animais dos grupos estudados. A suplementação com ácidos graxos saturado e PUFA não promoveu modificação significativa na produção de lactato, por estas células, quando comparado ao C. No grupo com tumor esta produção elevou-se em 4 vezes quando comparado aos grupos C, ST e PF e esta elevação foi estatisticamente diferente ($p<0,05$). No grupo com tumor ST este parâmetro foi idêntico ao RTC e, no RTPF houve diminuição significativa na produção de lactato quando comparado aos grupos RTC e RTST, entretanto ainda foi significativamente maior quando comparado ao C, ST e PF.

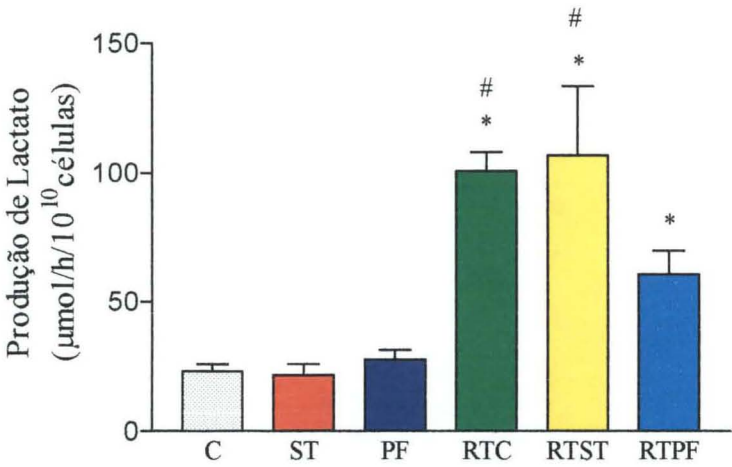


GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	18.06	1.18
ST	22.56	3.12
PF	20.84	3.68
RTC	199.32	16.95
RTST	194.68	10.11
RTPF	132.48	6.85

Figura 6: Produção de lactato pelos linfócitos do baço incubados com glicose 5,6 mM, BSA 1% em KR durante 1 hora a 37 °C, dos animais controle (C), saturado (ST) e PUFA (PF), ratos portadores de tumor (RTC), RT saturado (RTST) e RT PUFA (RTPF). Os dados representam a média ± EPM de 5 experimentos em quintuplicata.

* Diferença significativa (p<0,05) quando comparado aos grupos C, ST e PF.

Diferença significativa (p<0,05) quando comparado ao grupo RTPF.



GRUPOS	MÉDIA	EPM
C	23.06	2.7
ST	21.7	4.25
PF	27.74	3.58
RTC	100.78	7.23
RTST	106.96	26.6
RTPF	60.65	9.31

Figura 7: Produção de lactato pelos linfócitos do linfonodo mesentérico incubados com glicose 5,6 mM, BSA 1% em KR durante 1 hora a 37 °C, dos animais controle (C), saturado (ST) e PUFA (PF), ratos portadores de tumor (RTC), RT saturado (RTST) e RT PUFA (RTPF). Os dados representam a média ± EPM de 5 experimentos em quintuplicata.

* Diferença significativa quando comparado aos grupos C, ST e PF.

Diferença significativa quando comparado ao grupo RTPF.

V. DISCUSSÃO

Os ácidos graxos poliinsaturados n-3 são essenciais ao organismo e entre as suas diversas funções, podemos destacar como sendo constituintes de membranas celulares e precursores dos eicosanóides, que atuam como sinalizadores intracelulares, afetam a interação célula-célula e deste modo podem modular a funcionalidade dos linfócitos (POMPÉIA *et al.*, 2000). Estas células, frente a um estímulo do tipo invasivo, por exemplo tumor, tornam-se ativas e ávidas consumidoras de glicose. Vários estudos também têm relatado a influência da dieta dos PUFAs no tratamento de pacientes com câncer, principalmente em relação aos ácidos graxos n-3 (TISDALE, 1996; BARBER *et al.*, 1999).

Ao implantarmos o tumor de Walker 256, verificamos que o tratamento com PUFA induziu a uma taxa de crescimento menor do tumor quando comparado aos grupos RTC e RTST. O efeito quimioprotetor dos PUFAs contra crescimento tumoral é defendido na literatura entretanto, o seu mecanismo protetor é desconhecido (ROSE; CONNOLLY, 1999; GAYGILL; HILL, 1995). O menor crescimento tumoral foi acompanhado de manutenção da massa corpórea (Figuras 1), o que demonstra proteção contra o desenvolvimento da caquexia. Alguns trabalhos têm de fato relatado papel dos PUFAs, em pacientes com câncer, em reverter a caquexia presente nestes indivíduos (BARBER; ROSS; FEARON, 1998). TISDALE *et al.* (1996), demonstraram que dieta rica em PUFAs, principalmente em EPA, é capaz de inibir a depleção dos estoques energéticos, reduzindo, dessa forma, a perda de peso na caquexia induzida por tumor. Neste caso, o PUFA estaria mais atuando como agente inibidor de lipólise do que como fonte de energia. WIGMORE *et al.* (1996) observaram manutenção do peso corpóreo em pacientes portadores de tumor pancreático, através da suplementação com EPA, sugerindo que este possa ser um agente anticaquético, o que corrobora nossos resultados. Ainda, outros estudos relatam que o óleo de peixe exerce efeito protetor por inibir a formação de prostaglandinas PGE₂ (CAYGILL, 1995), importante fator angiogênico e catalítico envolvido na produção da síndrome da caquexia em indivíduos portadores de Tumor de Walker 256.

O tratamento com gordura saturada não foi capaz de promover a mesma proteção. Na verdade, população cuja dieta é rica em gordura saturada tem maiores índices de câncer do que as que consomem dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (CAYGILL *et al.*, 1996; CARROLL; BRADE, 1984).

A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados n-3 no grupo RTPF proporcionou uma taxa de sobrevivência maior (Figura 2) desses animais quando comparado aos grupos RTC e RTST. Este efeito positivo do PUFA é citado na literatura, que relata que a suplementação com óleo de peixe mais vitamina E notadamente aumenta o tempo de sobrevivência em pacientes com câncer com malignidade generalizada (GOGOS *et al.*, 1998). Nossos dados sem vitamina E chegaram aos mesmos resultados.

A glicemia e lactato sérico ajudam a entender o quadro caquético dos animais portadores de tumor, como parâmetro referencial para a caquexia. De fato, o tumor, por ser um ávido consumidor de glicose (FERNANDES *et al.*, 1991), induz a hipoglicemia (Figura 4) e hiperlaticidemia (Figura 5). O animal RTPF por ter menor taxa de crescimento tumoral não exportou lactato em quantidades apreciáveis, ficando até próximo aos valores controle. A glicemia teve tendência de recuperação mas ainda ficou abaixo do controle, mostrando que o tumor, apesar de seu crescimento reduzido, continua consumindo avidamente glicose. Dados do laboratório (não apresentados) demonstram que há recuperação parcial do glicogênio hepático (50%) neste grupo, o que corrobora aos achados de ação anti-caquético.

A pergunta que se faz é se os PUFAs têm ação direta sobre a célula tumoral, impedindo assim o desenvolvimento do câncer e caquexia ou se o faz através da modulação da atividade do sistema imunológico. Nossos resultados sobre o metabolismo de glicose em linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico (Figura 7) e baço (Figura 6) apontam para a primeira hipótese. A glicose por sua importância metabólica é capaz de fornecer energia, (ATP), no “shunt” das pentoses gera-se NADPH, importante para lipogênese e também nesta ela é precursora de purinas e pirimidinas. No grupo PF não houve aumento na produção de lactato, o que seria um índice de maior atividade metabólica e portanto maior participação no processo

inibitório. Obviamente, há a necessidade da mensuração de citocinas para confirmarmos ou não a participação efetiva do sistema imunológico como agente principal debrador do crescimento tumoral. Dados do laboratório (não apresentados) também demonstram que o perfil metabólico do macrófago é igual ao ocorrido no linfócito, ou seja, não é observado aumento na taxa de produção de lactato neste outro tipo de célula do sistema imunológico. Em suma, nossos dados apontam para uma ação dos PUFAs como agente protetor contra a velocidade de crescimento tumoral e agente anti-carcinogênico e pela análise metabólica da glicose há pouca, se há alguma, do sistema imune neste processo.

VI. CONCLUSÃO

Os ácidos graxos PUFAs ω -3 quando suplementados na dieta, por períodos crônicos, são hábeis em proteger o organismo contra a velocidade de crescimento tumoral, aumentar a taxa de sobrevivência e o sistema imunológico, pela análise do metabolismo da glicose, desempenha papel secundário neste processo.

VI. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

AL, M.D.M., VAN HOUWELINGER, A.C; HORNSTRA, G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and its relationship with the neonatal essential fatty acid status. **British Journal of Nutrition**, v.74, p. 55-68, 1995.

ALAM, S.Q., REN, Y.F.; ALAM, B.S. (³H)forskolin-and (³H)dihydroalprenolon-binding sites and adenylate cyclase activity in heart of rats fed diets containing different oil. **Lipids**, v.23, p. 207-213, 1988.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 3ed. Porto alegre: Artes Médicas, 1997.

ALBINO, A.P. *et al.* Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased pRb phosphorylation. **Cancer Research**, v.60, p. 4139-4145, 2000.

ANDERSON, R.E. Lipids of ocular tissue-IV Comparision of phospholipids from retinas of six mammalian species. **Experimental Eye Research**, v.10, p. 339, 1970.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v.212, p. 835-842, 1983.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Metabolismo in lymphocytes and its importance in the immune response. **Essays in Biochemistry**, v.21, p. 1-44, 1985.

ARGILES, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, v.17, n.5, p. 477-498, 1997.

ARGILES, J.M. *et al.* Tumor growth and nitrogen metabolism in host. **International Journal of Oncology**, v. 14, n.3, p. 479-486, 1999.

BAKKER, N.; VAN'T VEER, P.; ZOCK, P.L. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: an ecological study. EURAMIC Study Group. **International Journal of Cancer**. v.72, n.4, p. 587-591, 1997.

BALLOU, L.R.; CHEUNG, W.Y. Inhibition of human platelet phospholipase A₂ activity by unsaturated fatty acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, p. 371-375, 1985.

BARBER, M.D. *et al.* The effect of an oral nutritional supplement enrich with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v.81, n.1, p. 80-86, 1996.

BARBER; M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, C.H. The anti-caquetic effect of fatty acids. **Nutrition Society**, v.57, p. 571-576, 1998.

BEACH, R.S., GERSCHWIN, M.E.; HURLEY, L.S. Dietary zinc modulation of Moloney sarcoma virus oncogenesis. **Cancer Research**, v.41, p. 552-559, 1981.

BERNE, R.M.; LEVY, M. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1998.

BORGHANS, J.A.; NOEST, A.J.; BOER, R.J.de. How specifi should immunological memory be? **Journal of Immunology**, v.163, n.2, p. 569-575, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer- Pro-Onco. "**O Problema do Câncer no Brasil**". 4.ed. Rio de Janeiro, 1997.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition Reviews**, v.56, p. 70-83, 1998.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition Society**, v.57, p. 487-508, 1998.

CALDER, P.C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.55, p. 737-774, 1996.

CALDER, P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fish tale? **Nutrition Research**, v.21, p. 309-341, 2001.

CANGIANO, C. *et al.* Cancer cachexia: New pathogenic and therapeutic insights. **Nutrition**, v.12 (supp), n.1, p. 48-51, 1996.

CARROLL, K.K; BRADE, L.M. Dietary fat and carcinogenesis, **Nutrition and Cancer**, v.6, n.4, p. 254-259, 1984.

CARROLL, K.K.; KHOR, H.T. Dietary fat in relation tumorigenesis. **Progress in Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.10, p. 308-353, 1975.

CAYGILL, C.P.J. *et al.* Fat, fish, fish oil and cancer. **British Journal of Cancer**, v.74, n.1, p. 159-164, 1996.

CAYGILL, C.P.J.; HILL, M.J. Fish, n-3 fatty acids and human colorectal and breast cancer mortality. **European Journal of Cancer Prevention**, v.4, n.1, p. 329-332, 1995.

CLAUSEN, J.; MOLLER, Allergic encephalomyelitis induced by brain antigen after deficiency in polyunsaturated fatty acids during myelination. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v.36(suppl), p. 224-233, 1969.

COOPER, A.L. *et al.* Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. **Clinical Nutrition**, v.12, p. 321-328, 1993.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

CURI, R. **Metabolismo do linfócito e sua regulação**. Tese de livre docência. Instituto de Ciências Biomédicas, Dpto Fisiologia e Biofísica, São Paulo, 1993.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocytes mitochondria and isolated mouse macrophages. **Biochemical Journal**, v.250, p. 383-388, 1988.

DEVCHAND, P.R. *et al.* The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. **Nature**, v.384, p. 39-43, 1996.

ENDRES, S. *et al.* The effects of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **The New England Journal of Medicine**, v.320, p. 265-271, 1989.

ENGEL, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v.88, p. 475-484, 1978.

FERNANDES, G. *et al.* Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76. n.1, p.457-461, 1979.

GIACOSA, I. *et al.* Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition**, v.12(1 Suppl), p. 20-23, 1996.

GOGOS, C.A.A., *et al.*, Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamina E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy. **Cancer**, v.82, p. 395-402, 1998).

GOLDEN, M.H.N. *et al.* Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition. **Lancet**, v.1(8076), p. 1226, 1978.

HOLIAN, O.; NELSON, R. Action of long-chain fatty acids on protein kinase C activity: Comparison of omega and omega-3 fatty acids. **Anticancer Research**, v.12, p. 975-980, 1992.

IWATA, T. *et al.* Circulating thimic hormone levels in zinc deficiency. **Cellular Immunology**, v.47. n1, p. 100-105, 1979.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D., **Imunologia: O sistema imunológico na saúde e na doença**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JIANG, W.G.; BRYCE, R.P.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 1998, v.27, n.3, p. 179-209, 1998.

KANG, J.X and LEAF, A. Evidence of free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p. 3542-3546, 1996.

KELLER, H. *et al.* Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p. 2160-2164, 1993.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological Studies in the Upernavik District, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica**, v.208, n. 5, p. 401-406, 1980.

LEE, T.H. *et al.* Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. **The New England Journal of Medicine**, v.312, p. 1217-1224, 1985.

MEADE, C.J.; MERTIN, J. Fatty acids and immunity. **Advances in Lipid Research**, New York, v.16, p. 127-165, 1978.

MEYDANI, S.M. *et al.* Immunological effects of National Cholesterol Education Panel Step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, p. 105-113, 1993.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v.9, n.1, p. 4-9, 1997.

MERTIN, J.; HUGHES, D. Specific inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on lymphocyte transformation induced by PHA and PPd. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v.48, p. 203-10, 1975.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, **Immunology Today**, v.17, p. 138-146, 1996.

PEKAREK, R.S. *et al.* Abnormal cellular immune responses during acquired zinc deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.32, p.1466, 1979.

POMPÉIA, C. *et al.* Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p. 1255-1268, 2000.

POMPÉIA, C.; PROCÓPIO, J; CURI, R. Fatty acids and the immune system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.35, n.2, p. 165-194, 1999.

PRENTICE, R.L.; SHEPPARD, L. Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. **Cancer Causes & Control**, v.1, n.1, p.81-97, discussion 99-109, 1990.

PURASIRI, P. *et al.* Modulation of cytokine production in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. **Clinical Science**, v.87, n.6, p. 711-717, 1994.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; DAVID, M. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v.83, p. 217-244, 1999.

ROUBENOFF , R., ROUBENOFF, R.A., WARD, L.M., HOLLAND, S.M.; HELLMAN D.B. Rheumatoid cachexia: Depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. **The Journal of Rheumatology**, V.19, P. 1505-1510, 1992.

SASAKI, S.; HORACSEK, M. KESTELOOT, H. An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality. **Preventive Medicine**, v.22, p. 187-202, 1993.

SAKURAI, Y.; KLEIN, S. Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. **Surgery Today**, v.28, n.3, p. 247-257, 1998.

SCROFERNEKER, M.L.; POHLMANN, P.R. **Imunologia básica e aplicada**. 1.ed. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998.

SPEIZER, L.A., WATSON, M.J. and BRUTON, L.L. Differential effects of omega-3 fish oils on protein kinase activities in vitro. **American Journal of Physiology**, v.261, p. 114, 1991.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2^a ed. São Paulo, Manole Ltda, 1998.

SUMIDA, C., VALLETE, G. and NUNEZ, E.A. Interaction of unsaturated fatty acids with rat liver glucocorticoid receptor: studies to localise the site of interaction. **Acta Endocrinologica**, v.129, p. 348-355, 1993.

THEOLOGIDES, A. Cancer cachexia. **Cancer**, v.43, p. 2004-2012, 1979.

TISDALE, M. J. Mechanism of lipid mobilisation associated with cancer cachexia: Interaction between the polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic and inhibitory guanine nucleotide-regulatory protein. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential fatty Acids**, v.48, p. 105-09, 1993.

TISDALE, M.J. Induction of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, V.12(suppl), P. 531-533, 1996.

UNANUE, E. R.; BENACERRAF, B. **Bases celulares da imunidade**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

VALLETE, G., VANET, A., SUMIDA, C.; NUNEZ, E.A., Modulatory effects of unsaturated fatty acids on the binding of glucocorticoids to rat liver glucocorticoid receptors. **Endocrinology**, v.129, p. 1363-1369, 1991.

VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S.; CURI, R. Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Paraná, v.33, p. 819-829, 1990.

WALLACE, F.A *et al.* Dietary fat influences the production of Th1-but not Th2-derived cytokines. **Lipids**, v.34, p. 141, 1999.

WIGMORE, S.J. Inhibition of Lipolysis and Muscle Protein Degradation by EPA in Cancer Cachexia, **Nutrition**, v.12 (supp), n.1, p. 31-33, 1996.

WIGMORE, S.J. *et al.* The Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on the Progress of Cachexia in Patients With Pancreatic Cancer, **Nutrition**, v.12 (supp), n.1, p. 27-30, 1996.

WIGMORE, S.J., FEARON, K.C.H.; ROSS, J.A. Modulation of human hepatocyte acute phase protein production in vitro by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **Annals of Surgery**, v.225, p. 103-111, 1997.